

# Анализ на микробната колонизация на скалните рисунки в пещерата Магура с цел опазването им

Милена Митова <sup>а</sup>, Михаил Илиев <sup>б</sup>, Ралица Ангелова <sup>в</sup>, Венета Грудева <sup>г</sup>

<sup>а</sup>Катедра по Обща и промишлена микробиология, Биологически факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Бул. Драган Цанков 8, София 1421, [mmitowa@abv.bg](mailto:mmitowa@abv.bg),

<sup>б</sup>Катедра по Обща и промишлена микробиология, Биологически факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Бул. Драган Цанков 8, София 1421, [bacto@abv.bg](mailto:bacto@abv.bg)

<sup>в</sup>Катедра по Обща и промишлена микробиология, Биологически факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Бул. Драган Цанков 8, София 1421, [angelova87@abv.bg](mailto:angelova87@abv.bg)

<sup>г</sup>Катедра по Обща и промишлена микробиология, Биологически факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Бул. Драган Цанков 8, София 1421, [vgr@biofac.uni-sofia.bg](mailto:vgr@biofac.uni-sofia.bg)

---

## Analysis of the microbial colonization of the rock paintings in the Magura Cave aimed at their preservation

Milena Mitova, Mihail Iliev, Ralitsa Angelova, Veneta Grudeva

<sup>1</sup>Department of General and Industrial Microbiology, Faculty of Biology, Sofia University St. Kliment Ohridski, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria; [mmitowa@abv.bg](mailto:mmitowa@abv.bg),

<sup>2</sup>Department of General and Industrial Microbiology, Faculty of Biology, Sofia University St. Kliment Ohridski, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria; [bacto@abv.bg](mailto:bacto@abv.bg)

<sup>3</sup>Department of General and Industrial Microbiology, Faculty of Biology, Sofia University St. Kliment Ohridski, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria; [angelova87@abv.bg](mailto:angelova87@abv.bg)

<sup>4</sup>Department of General and Industrial Microbiology, Faculty of Biology, Sofia University St. Kliment Ohridski, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria; [vgr@biofac.uni-sofia.bg](mailto:vgr@biofac.uni-sofia.bg)

### ABSTRACT

The microbial diversity in caves and the role of microbial communities in rock paintings destruction is a topic of present interest.

The aim of the recent study is focused on the characterization of the microbial communities inhabiting the Magura Cave in order to develop a strategy for conservation of the unique paintings in the cave. Aimed at estimating the dynamics of microbial populations inhabiting the Magura Cave, four subsequent samplings were done in the course of twelve months.

The comparative analysis of the microbial communities clearly demonstrates that each sample, respectively location, possess a unique microbial population structure and specific ratios between the different target groups, slightly changed during the monitoring investigation.

The analysis revealed the presence of all tested physiological groups with the predominance of psychrophiles and oligiocarbophiles. Slightly variations in the number of actinomyces and fungi were observed among the different locations.

### KEYWORDS

Biodiversity, Biodeteriogens, Prehistoric paintings, Microbial monitoring, Magura Cave

---



Обр. 1. Места на вземане на проби в пещерата Магура - детайли (автор П. Грозданов)

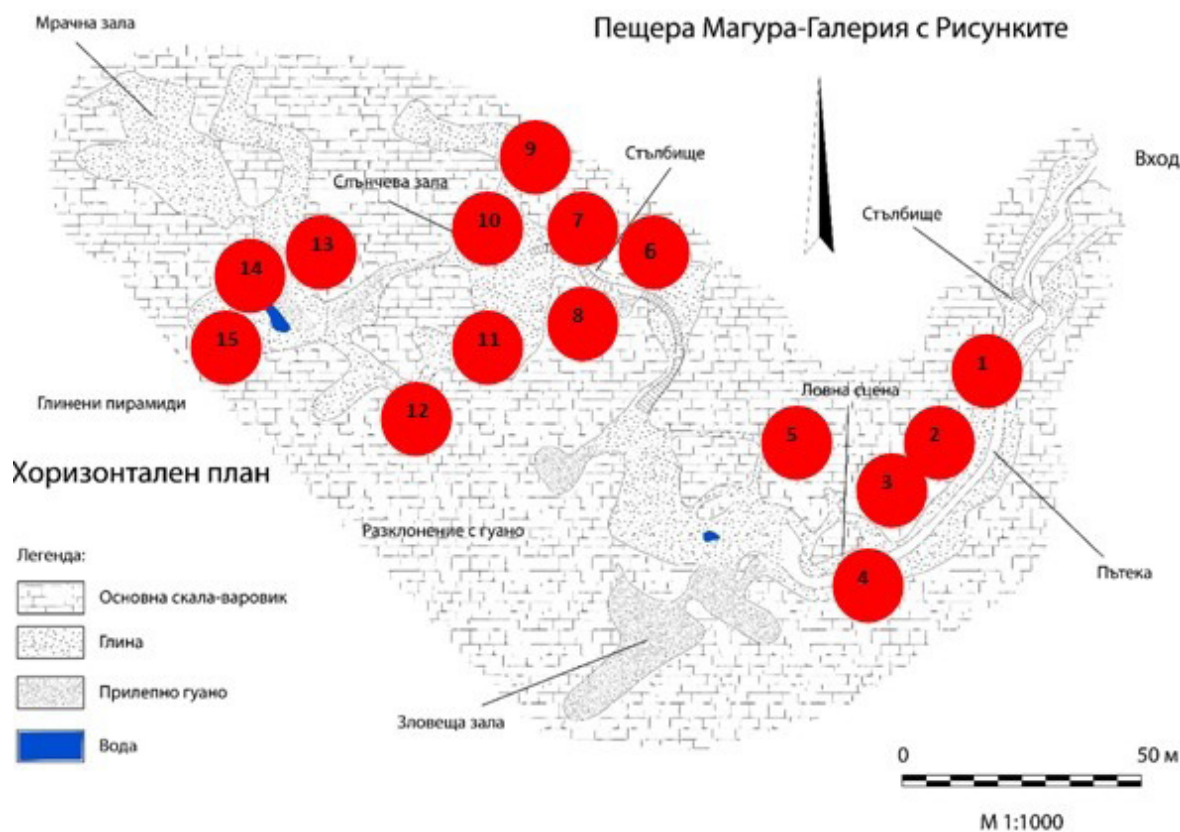
Fig 1. Locations of sampling in Magura Cave: details (author P. Grozdanov)

## Въведение

Изследването на микробното разнообразие в пещерите и ролята на микробните съобщества в разрушаването на пещерните рисунки е особено актуално. Открити са микробни видове, разрушаващи палеолитни рисунки на възраст 15 000 г., които са разпространени по целите стени на пещера Алтамира, Испания. Анализът на тези микробни видове показва, че те са в състояние да колонизират рисунките и с метаболитната си активност системно да ги разрушават. Тяхното опазване е световен проблем. През последните няколко години опазването на скалните рисунки в европейските пещери предизвиква публични дебати. Идентифицирането на микроорганизми със специфични физиологични особености като потенциални биодетериогени на скалните рисунки е първа стъпка в разработването на стратегия за тяхното опазване.

Изследването на увреждащите ефекти, предизвикани от микроорганизмите върху пещерните рисунки включва два етапа. Първо се прави обща характеристика на микробните съобщества и се определят потенциалните биодетериогени. Вторият етап включва изследване на метаболитната активност на тези видове за определяне на типа на техния деструкционен ефект.

Съществен проблем при тези изследвания е подборът на физиологичните и систематичните групи микроорганизми, които подлежат на анализ. В това отношение съществуват сериозни разногласия. Те произтичат от голямото разнообразие на микробните съобщества в различните пещери от една страна и влиянието на физичните и химичните фактори на средата върху тези съобщества, специфични за всеки хабитат. Най-типични за пещерите са психрофилните микроорганизми като разнообразието в тази физиологична група е твърде голямо (Engel et al. 2004; Barton, Northup 2007). В проби от капеща вода в пещерата Алтамира (Сантаяна дел Мар, Испания) е установено голямо разнообразие на микробните ценози. Доказано е присъствие на представители на *Vibrionaceae*, *Nocadioides*, *Amycolatopsis*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Enterobacter amnigenus*, *Serratia liquefaciens*, *Erwinia sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chryseomonas luteola*, *Xanthomonas maltophilia*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Acinetobacter sp.*, *Kingella kingae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* (Laiz et al. 1999). В проби от палеолитни рисунки в същата пещера се установява (Schabereiter-Gurtner et al. 2002) следното съдържание на бактерии: *Proteobacteria* – 52,3%, *Acidobacterium* – 23,8%,



Обр. 2. Галерия с рисунките – прецизиране на локациите на пробовземане в периода на опробване (автор К. Стоилов)

Fig 2. Painting Gallery – the exact locations of sampling during the tested period (author K. Stoilov)

*Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides* – 9,5%, зелени не серни бактерии – 4,8%), *Planctomycetales* – 4,8%), *Actinobacteria* – 4,8%. Същите автори провеждат филогенетични анализи на 16S rRNA, свързани с присъствието на комплексни и частично непознати бактериални съобщества в проби от рисунки в пещерата Тито Бастилио (Испания) и доказват присъствие на *Rhizobiaceae*, *Xanthomonas*, *Nitrospira* sp., *Nitrosospira* sp., *Nitrosovibrio* sp., *Nitrosococcus* sp., *Aeromonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Neisseriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Thiothrix*, *Xanthomonas*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera*, *Thiothrix*, *Thiomicrospira*, *Beggiatoa*, *Achromatium*, *Sulfobacillus*, *Thioalobrio* sp., *Desulfovibrio* sp., *Leptoprillum ferrooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Geothrix fermentans*, *Acidobacterium capsulatum*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces* spp. В същата пещера са изследвани метаболитно активни микробни съобщества от жълти и сиви колонизации по стените на пещерата и установяват наличие на *Alpha-proteobacteria* (*Rhizobiales*, *Shingomonadales*), *Beta-proteobacteria* (*Nitrosomonadales*, *Burkholderiales*, *Thauera*), *Gamma-proteobacteria* (*Pseudomonadales*, *Enterobacteriales*, *Chromatiales*), *Delta-proteobacteria* (*Desulfovibrio*, *Mycococcus*), *Firmicutes* (*Streptococcus*) (Portillo et al. 2008).

Jennifer L. Macaladyet и колектив (Macaladyet et al. 2008) изследват пещерна система Фрасаци (Италия) за диференциация на ниши между сяро-окисляващи бактериални популации в пещерни води и установят присъствие на родовете *Thiothrix*, *Beggiatoa*, *Thiovigra*, *Thiobacillus*, *Thiomonas*, *Arcobacter* и видовете *Sulfurovum lithotrophicum*, *Sulfuricurvum kujiense*. Данни от тази пещера разкриват изобилни и разнообразни *Delta proteobacteria* в биофилми от потоци, които включват много фило типове свър-

Група микроорганизми	Хранителна среда	Условия на култивиране
Облигатни психрофили	PsC агар	0°C, 4седмици
Факултативни психрофили	PsC агар	15 °C, 7 дни
Спорообразувачи	МПА + МПА + YGC(пастьоризация)	28 °C, 48 ч.
Денитрификатори	Гилтай	28 °C, 72 ч.
Амонификатори	МПБ + фенолрот	28 °C, 72 ч.
Уробактерии	Федоров	28 °C, 48 ч.
Неутрофилни железобактерии	Федоров	28 °C, 7 дни
Ацидофилни железобактерии	9К	28 °C, 7 дни
Олигокарбофили	МПБ (разреждане 1: 100)	28 °C, 48 ч.
Силикатни бактерии	КА	28 °C, 48 ч.
Сулфат-редуциращи бактерии	Пфенинг	28 °C, 7 дни
Актиномицети	Гаузе	28 °C, 7 дни
Гъби	Сабуро + АБ	28 °C, 7 дни

Таблица № 1. Хранителни среди и условия на култивиране  
Table 1. Nutrient media and Sample cultivation

зани с родовете *Desulfocapsa* (14 филотипа), *Desulfonema* (7 филотипа), както и родовете *Syztrophobacter*, *Syntrophus*, видовете *Desulfoarculum baarsii*, *Desulfobacter postgatei* и семействата *Desulfomonile* и *Geobacteraceae*. Доказано е и присъствие на *Acidithiobacillus*, *Thermoplasmata*, *Sulfobacillus*, *Acidimicrobium*, *Ferroplasma*. В същата пещера е проведено обстойно изследване на сулфат-редуциращите бактерии и е установено доминиращо присъствие на родовете *Desulfovibrio* и *Desulfosarcina* (Macaladyet et al. 2007).

При провеждане на молекулна характеристика на метаболитно активни бактериални съобщества от „бели колонизации“ в пещерата Алтамира (Сантяна дел Мар, Испания) се доказва присъствие на *Pseudomonadales* (*Azotobacter*, *Pseudomonas*), *Enterobacteriales* (*Escherichia*), *Methylococcales* (*Methylocaldum*), *Rhizobiales* (*Phyllobacterium*), *Rhodobacterales* (*Octadecabacter*), *Sphingomonadales* (*Sphingomonas*), *Desulfuro monadales* (*Geobacteraceae*), *Myxococcales* (*Chondromyces*), *Burkholderiales* (*Ralstonia* и *Ideonella*), *Nitrosomonadales* (*Nitrosospira*) (Portillo et al. 2008).

Същевременно е установено, че с увеличаване на въздействието на антропогенния фактор намалява биоразнообразието в пещерите, както и филогенетичното разнообразие на получените изолати (Ikner et al. 2007)

Пещерата Магура с нейните уникални скални рисунки е ценно национално богатство (Трантеев 1962; Попов 1987). Праисторическите рисунки в Галерията с рисунките на пещерата Магура също са подложени на биологична деструкция в резултат на нарушено екологическо (биологично и физикохимично) равновесие. По повърхността на рисунките се наблюдава зелена и сива корица, която се напуква и бавно руши гуаното, с което са направени тези рисунки. На базата на данните за характера на микробните ценози в други пещери могат да се направят допускания относно характера на микробната колонизация и потенциалния биодетериогенен ефект.

Основната цел на настоящата работа е да се направи характеристика на микробните ценози в залата с рисунките на пещерата Магура като първи етап в разработването на стратегия за тяхното опазване.

## Материали и методи

Обект на изследване са проби от скалните рисунки в галерията с рисунките на пещерата Магура (обр. 1). Направен беше обстоен визуален оглед и бяха локализираните местата на пробовземането на базата на изменения на рисунките, изменения на скалата, водни проби и проби от прилепно гуано (обр. 2).

Пробовземането, съхранението на пробите и транспортирането им са извършени съгласно стандартни процедури. На базата на наличните в литературата данни за микробните съобщества в други пещери обект на анализ бяха 14 групи микроорганизми. Обект на микробиологичен мониторинг са 15 проби от галерията с рисунките. Направени са 4 опробвания за периода 02.04.2011 – 03.03.2012 г.

Анализът на изследваните групи микроорганизми е извършен по стандартни процедури с използване на селективни хранителни среди и различни методи за количествен анализ на микроорганизмите (Грудева и др. 2006).

Изследваните групи бактерии, използваните хранителни среди и условията на култивиране са посочени в таблицата (таблица 1).

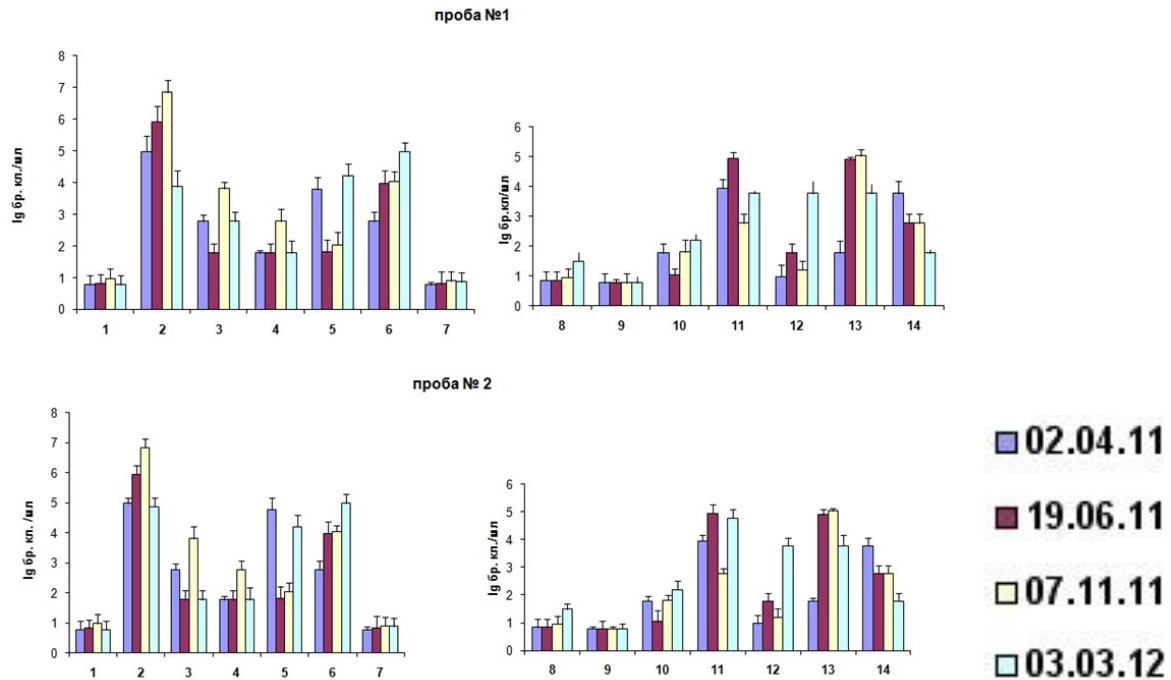
## Резултати и обсъждане

Резултатите от количествения анализ на някои от изследваните проби са представени на диаграмата (диаграма 1). Анализът на тези резултати както при еднократните опробвания така и при мониторинга ясно показват, че в пещерата съществува постоянно микробно съобщество със строго специфичен количествен и качествен състав.

Количеството на облигатните психрофили е незначително – единични колонии само в някои от пробите. Това не е изненадващо тъй като температурата в пещерата е със стойности над оптималната за развитие на тази група. Поради същата причина и количеството на факултативните психрофили е постоянно високо и е задължително > 10<sup>6</sup> кл/мл. В повечето от пробите се установява присъствие на високи количества сулфатредуктори, амонификатори и денитрификатори. Количеството на актиномицетите варира и силно се повлиява от сезона и типа на анализираната проба. Същото заключение е валидно и за гъбите. В пробите от рисунките е слабо присъствието на неутрофилни железобактерии. Ацидофилните железобактерии присъстват единствено в пробите от скалата на пещерата. В тази локация са открити и завишени количества на силикатни бактерии. Очевидно е, че физикохимичните параметри на средата са относително постоянни и това се потвърди и от провежданите анализи на температурата, влажността и рН при всяко пробовземане. Температурата варира между 10–13° С, влажността на въздуха между 65–80%, а рН на пробите между 6.8–7.2. Тези относително постоянни условия вероятно са причина за слабо проявените флуктуации в количествата на отделните групи през отделните сезони.

Друг особено съществен извод от направените изследвания е установеното доминиране на групи микроорганизми, за които няма данни за детериогенен ефект (амонификатори, денитрификатори). Същевременно във всички анализирани проби от рисунките е констатирано слабо присъствие на бактерии, класифицирани като типични детериогени (нитрификатори, ацидофилни железобактерии, силикатни бактерии).

Независимо от слабото присъствие на тези бактерии, видовият им състав има



Диаграма 1. Количествен анализ на микроорганизмите в някои от изследваните проби  
 Diagram 1. Quantitative analysis of microorganisms in same samples

- |  |  |
|--|--|
| <p>1 – Облигатни психрофили; 2 – Факултативни психрофили;<br/>                 3 – Спорообразуващи; 4 – Нитрификатори;<br/>                 5 – Денитрификаторим;<br/>                 6 – Амонификатори; 7 – Уробактерии;</p> | <p>1 – Obligate psychrophiles; 2 – Facultative psychrophiles; 3 – Sporeforming bacteria; 4 – Nitrifiers;<br/>                 5 – Denitrifiers; 6- Amonificators; 7 – Urobacteria;</p> |
| <p>8 – Неутро(Fe) бактерии;<br/>                 9 – Ацидофилни (Fe) бактерии; 10 – Олигокарбофили; 11 – силикатни; 12 – Сулфат- редуциращи; 13 – Актиномицети; 14 – Гъби</p>  | <p>8 – Neutrophilic ironbacteria; 9 – Acidophilic iron bacteria; 10 – Oligocarbofiles; 11 – Silocate bacteria; 12 – Sulphate-reducing bacteria; 13 – Actinomices; 14 – Fungi</p>       |

значение. В пробите са установени представители на родовете *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*.

Сходни резултати за характера на микробните ценози са докладвани и от други автори за различни пещери. Разбира се, да се прави аналогия е трудно, поради големите различия в типовете пещери и конкретните условия в тях. Тези данни за пещерата Магура обаче имат стойност за разработване на стратегия за опазване на скалните рисунки. Очевидно е, че при условията на ограничен достъп в залата с рисунките и относително постоянните физикохимични параметри на средата, рисунките не са застрашени сериозно от биодеструкционни процеси. Единствено постоянното присъствие на актиномицети и гъби макар и в не особено високи количества, представлява потенциална опасност за тях тъй като за тези две групи има данни за негативно влияние върху рисунки и скални паметници. Освен с метаболитната си активност тези микроорганизми оказват негативен ефект с пигментите, които отделят, както и по силата на механична деструкция. В този случай е задължително определянето на видовия състав на актиномицетите и особено на гъбите което е обект на текущи анализи.

Внимание заслужават и резултатите за високи количества на силикатните бактерии в пробите от скалите. Тези бактерии имат доказан биоразрушаващ ефект именно върху такъв тип материали и при интензивното им развитие резултатите са трудно предвидими.

По-различна обаче ще бъде микробиологичната находка, ако се осъществи свободен достъп на посетители в залата с рисунките. Вторично попадналите микроорганизми при тази ситуация биха променили съществено характера на микробните ценози и резултатите от това са трудно предвидими. Това налага особено внимателно обсъждане на експлоатирането на пещерата като туристически обект и изработване на стратегия за опазването на рисунките.

### Благодарности

Колективът изказва благодарности на колегите от пещерен клуб „Хелактит“ за активната помощ при пробовземанията както и на администрацията на пещерата за съдействието.

Изследванията са финансирани от проект 73/2011 на Фонд „Научни изследвания“ на МОН.

### Цитирана литература

- Грудева, В., Мончева, П., Наумова, С., Гочева, Б., Недева, Т., Антонова-Николова, С. 2006. *Ръководство по микробиология*. София: Университетско издателство „Св. Климент Охридски“.
- Попов, В. 1987. *Благоустроените пещери в България*. София: „Медицина и физкултура“.
- Трантеев, П. 1962. *Магура*. София: „Медицина и физкултура“.
- Barton, H.A., Northup, D.E. 2007. Geomicrobiology in cave environments: Past, current, and future. *Journal of Cave and Karst Studies* 69, 163–178.
- Engel, A.S., Stern, L.A., Bennett, A. 2003. Condensation on cave walls: Implications for cave enlargement and sulfuric acid speleogenesis. *Geochemica et Cosmochimica Acta* 67, A455.
- Ikner, L.A., Toomey, R.S., Nolan, G., Neilson, J.W., Pryor, B.M. & Maier R.M. 2007. Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona. *Microbial Ecology* 53, 30-42.
- Laiz, L., Groth, I., Gonzalez, I., Saiz-Jimenez, C. 1999. Microbiological study of the dripping water in Altamira Cave (Santillana del Mar, Spain). *Journal of Microbiological Methods* 36, 129-138.
- Macalady, J.L., Jones, D. S., Lyon, E.H. 2007. Extremely acidic pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environmental Microbiology* 9, Issue 6, 1402-1414.
- Macalady, J.L., Dattagupta, S., Schaperdoth I., Jones D.S, Druschel G.K., Eastman D. 2008. Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters. *The ISME Journal* 2008 2, 590-601.
- Portillo, M.C., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. 2008. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. *Journal of Applied Microbiology* 104, 681-69.

Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Pinar, G., Lubitz, W., Rolleke, S. 2002. Cave paleolithic paintings harbour complex and partly unknown microbial communities. *FEMS Microbiology Letters* 211, 7-11.

## Analysis of the microbial colonization of the rock paintings in the Magura Cave aimed at their preservation

---

Milena Mitova, Mihail Iliev, Ralitsa Angelova, Veneta Grudeva

(summary)

The study of the microbial diversity in caves and the role of microbial communities in the destruction of cave paintings is a problem of great interest. Different groups of microorganisms have a negative effect on paintings. The rock drawings in the Magura Cave represent important cultural heritage and special care must be taken for their protection. For this reason analyzing the main group of microorganisms and assessment of the potential risk of their presence is the first step in the strategy for conservation of the paintings.

The analysis of the microbial colonization and its dynamics in the gallery with the paintings in the Magura Cave is the aim of this work. For the realization of the aim, visual evaluation of the state of the cave paintings was carried out. Samples were taken from areas with suspicion for biodestruction. Fourteen main groups of microorganisms were analyzed and dominant ones were determined.

The comparative analysis of the microbial communities clearly demonstrates that each sample, respectively location, possess a unique microbial population structure and specific ratios between the different target groups, slightly changed during the monitoring investigation.

The analysis of the results shows that in the gallery with the paintings, there is a stable microbial community which quantity and quality strongly depended on the season. As a permanent component of the microbial community are ammonifiers, nitrifiers and denitrifiers, as well as actinomycetes and fungi. Few groups of microorganisms recognized as typical biodestructors have been found in the samples analyzed. Their presence can damage the paintings and a strategy for limitation of their growth must be developed.